

BEST AVAILABLE COPY

09/807783
PC N 99/00157

证 明

本证明之附件是向本局提交的下列专利申请副本

申 请 日: 98 10 19

申 请 号: 98 1 20633.6

申 请 类 别: 发 明

发 明 创 造 名 称: 冻干甲型肝炎减毒活疫苗及其保护剂

发 明 人 或 设 计 人: 刘景晔 王鹏富 李光谱 谢宝生 宋宗明

李淑焱 刘 晶 于 颖 张喜珍 梁 本

刘令九 王 玮 张 玲 薛 勇 李晶

李玉红 林 辉 万宗举

申 请 人: 卫生部长春生物制品研究所

中 华 人 民 共 和 国

国家知识产权局局长

姜颖

99 年 10 月 11 日

PRIORITY
DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)



1. 一种可在常温下长期保存的, 冷冻干燥形式的甲型肝炎活疫苗组合物, 特征在于该疫苗组合物由预防有效剂量的减毒的甲型肝炎活病毒和活病毒疫苗保护剂组成。

2. 根据权利要求 1 的疫苗组合物, 其中所说的甲型肝炎活病毒是按已知方法制备的。

3. 根据权利要求 1 的疫苗组合物, 其中所说的病毒活疫苗保护剂由人血清白蛋白和/或明胶、以及适当量的海藻糖、选自谷氨酸、精氨酸、天冬氨酸和赖氨酸的一种或两种氨基酸或其碱金属盐, 以及抗坏血酸、尿素、甘露醇和肌醇组成的, 且其中所说的氨基酸碱金属盐最好是谷氨酸钠。

4. 根据权利要求 1 的疫苗组合物, 其中所说的冻干病毒疫苗保护剂中各成分的含量分别为人血清白蛋白 0-20g /L, 明胶 5-10g /L, 海藻糖 50-100g /L, 谷氨酸钠 7.5-15 g /L, 抗坏血酸 0.5-1 g /L, 尿素 5-28 g /L, 山梨醇 2-10 g /L 和肌醇 5-10 g /L。

5. 根据权利要求 1 的疫苗组合物, 其中所说的病毒活疫苗保护剂也可以不含有血清白蛋白。

6. 制备如权利要求 1 至 5 中任何一项限定的冷冻干燥的甲型肝炎病毒减毒活疫苗的方法, 该方法包括:

(1) 提供甲型肝炎病毒活病毒疫苗原液;

(2) 在步骤(1)中所述的病毒疫苗原液中, 按 1:1(V/V)的比例加入由人血清白蛋白和/或明胶、海藻糖、抗坏血酸、选自谷氨酸、精氨酸、天冬氨酸和赖氨酸的一种或两种氨基酸或其碱性金属盐、尿素、甘露醇和肌醇组成的活病毒疫苗保护剂并混匀之;

(3) 冷冻干燥步骤(2)中得到的疫苗组合物。

7. 根据权利要求 6 的方法, 其中步骤(3)所说的冷冻干燥步骤包括首先将所说的疫苗组合物于大约-20 至-50 °C 的温度下预冷冻 3 至 6 小时, 然后在适当的冻干装置中真空干燥 10 至 20 小时。

8. 一种病毒减毒活疫苗冻干保护剂, 该保护剂基本上由人血清蛋白和/或明胶、海藻糖、抗坏血酸, 选自谷氨酸、精氨酸、天冬氨酸和赖氨酸的一种或两种氨基酸或其碱金属盐、尿素、以及甘露醇和肌醇组成。

9. 根据权利要求 8 的保护剂, 其中各组成成分的含量分别为: 人血清白蛋

白 0-20g/L，明胶 5-10 g/L，海藻糖 50-100 g/L，谷氨酸钠 7.5-15 g/L，抗坏血酸 0.5-1 g/L，尿素 5-28 g/L，山梨醇 2-10 g/L 和肌醇 5-10 g/L。

10. 根据权利要求 8 的保护剂，其中所说的保护剂适用于保护选自肠道病毒、付粘病毒、虫媒病毒和疱疹病毒的冻干过程及冻干状态下的活病毒疫苗制剂。

冻干甲型肝炎减毒活疫苗及其保护剂

本发明总地涉及甲型肝炎疫苗,特别是涉及冷冻干燥形式的甲型肝炎减毒活疫苗和其工业规模大批量生产方法。本发明进一步涉及冷冻干燥病毒疫苗的保护剂,及其在生产冷冻干燥的病毒活疫苗,特别是冷冻干燥的甲型肝炎病毒活疫苗中的应用。

甲型肝炎是一种由自然界广泛存在的甲型肝炎病毒(HAV)引起的全球性高发病率的急性传染病。由于甲型肝炎流行很普遍而且蔓延迅速,所以甲肝的流行已成为一个严重的公共卫生问题。据统计,全世界约有 40 亿人口受到该疾病的威胁。在包括中国在内的发展中国家,由于人口众多,社会经济和公共卫生条件相对落后,所以常常在某些局部地区有甲型肝炎的大规模暴发流行,特别是在天然灾害之后。在经济发展的美国,每年约有 10,000 例肝炎病人与甲型肝炎病毒感染有关。据粗略统计,在中国有近 5 亿人口受到甲型肝炎的威胁,每 10 万人口约有 200 至 300 人遭受感染。因此,发展高特异性和安全性的甲肝病毒疫苗是临床病毒学研究中的一个重要课题。自本世纪七十年代以来,许多研究者致力于甲型肝炎灭活疫苗或病毒活疫苗的研究。例如,美国专利 4,164,566 公开了在亚人类灵长目的动物(如狨猴)细胞培养物中连续传代选育甲型肝炎病毒,并以所得到的甲型肝炎病毒 CR326 病毒株在多种细胞系内传代增殖,以制备甲型肝炎疫苗。美国专利 4,532,215 号和 4,636,469 号公别公开了从甲型肝炎病人粪便中分离野生病毒,至少经 5 次传代以制备可用作疫苗的 HM-175 病毒株的方法。美国专利 4,506,016 号公开了使甲肝病毒首先适当于人肾细胞系,然后再适应于人肺成纤维细胞,以制备减毒的甲型肝炎疫苗的方法。已授权的中国专利 85107525 号和中国专利 92114998 号分别公开了甲型肝炎 H₂ 病毒的方法,以及分别以这些病毒株作为毒种制备甲型肝炎活疫苗的方法。另外,中国专利申请 94101257.3 号公开了以悬浮吸附法增殖甲型肝炎病毒的技术。然而,按这些现有技术制备的甲型肝炎活疫苗制品几乎都是悬浮液剂型的。在几乎不含营养成分的悬浮介质中,游离的活病毒不能在常温下长时间存活,既使在 2 ~ 8 °C 的低温条件下也只有 3 ~ 6 个月的贮存有效期。因此,必需在低温冷藏条件下即通过所谓“冷链”运输、贮存和使用,从而使病毒活疫苗的大规模推广使用,特别是在经济不发达地区及

热带和亚热带地区的推广使用受到很大的限制。鉴于上述这些事实，本发明人经过长期的反复研究，设计并成功地配制了用于病毒减毒活疫苗，特别是甲型肝炎活疫苗冷冻干燥制品的保护剂，并成功地制备了冷冻干燥形式的甲型肝炎病毒活疫苗制剂，从而完成了本发明。

因此，本发明的一个目的是提供一种可在常温下长期保存的，冷冻干燥形式的甲型肝炎活疫苗组合物，特征在于该疫苗组合物由预防有效剂量的减毒的甲型肝炎活病毒和活病毒疫苗保护剂组成。

根据本发明这一目的的一个优选实施方案，其中所说的甲型肝炎活病毒是按已知方法制备的。

根据本发明这一目的的一个优选实施方案，其中所说的病毒活疫苗保护剂由人血清白蛋白和/或明胶、以及适当量的海藻糖、选自谷氨酸、精氨酸、天冬氨酸和赖氨酸的一种或两种氨基酸或其碱金属盐，以及抗坏血酸、尿素、甘露醇和肌醇组成的，且其中所说的氨基酸碱金属盐最好是谷胺酸钠。

根据本发明这一目的的一个优选实施方案，其中所说的冻干病毒疫苗保护剂中各成分的含量分别为人血清白蛋白 0-20g /L，明胶 5-10g /L，海藻糖 50-100g /L，谷氨酸钠 7.5-15 g /L，抗坏血酸 0.5-1g /L，尿素 5-28 g /L，山梨醇 2-10 g /L和肌醇 5-10 g /L。

根据本发明这一目的的一个优选实施方案，其中所说的病毒活疫苗保护剂也可以不含有血清白蛋白。

本发明的另一个目的是提供一种制备如上文限定的冷冻干燥的甲型肝炎病毒减毒活疫苗的方法，该方法包括：

- (1) 提供甲型肝炎病毒活病毒疫苗原液；
- (2) 在步骤(1)中所述的病毒疫苗原液中，按 1:1(V/V)的比例加入由人血清白蛋白和/或明胶、海藻糖、抗坏血酸、选自谷氨酸、精氨酸、天冬氨酸和赖氨酸的一种或两种氨基酸或其碱性金属盐、尿素、甘露醇和肌醇组成的活病毒疫苗保护剂并混匀之；
- (3) 冷冻干燥步骤(2)中得到的疫苗组合物。

根据本发明这一目的的一个优选实施方案，其中步骤(3)所说的冷冻干燥步骤包括首先将所说的疫苗组合物于大约-20 至-50 °C 的温度下预冷冻 3 至 6 小时，然后在适当的冻干装置中真空干燥 10 至 20 小时。

本发明的再一个目的是提供一种病毒活疫苗冻干保护剂,该保护剂基本上由人血清蛋白和/或明胶、海藻糖、抗坏血酸,选自谷氨酸、精氨酸、天冬氨酸和赖氨酸的一种或两种氨基酸或其碱金属盐、尿素、以及甘露醇和肌醇组成。

根据本发明这一目的的一个优选实施方案,其中所说的保护剂各成分的含量分别为:人血清白蛋白 0-20g/L,明胶 5-10 g/L,海藻糖 50-100 g/L,谷氨酸钠 7.5-15 g/L,抗坏血酸 0.5-1 g/L,尿素 5-28 g/L,山梨醇 2-10 g/L 和肌醇 5-10 g/L。

根据本发明这一目的的优选实施方案,其中所说的保护剂适用于保护选自肠道病毒、付粘病毒、虫媒病毒和疱疹病毒的冻干过程及冻干状态下的活病毒疫苗制剂。

本发明提供了冷冻干燥形式的甲型肝炎病毒活疫苗组合物,其特征在于该组合物由预防甲型肝炎有效量的甲型肝炎减毒活疫苗和适当量的活病毒疫苗保护剂组成。

一般说来,用于诱导或增加哺乳动物,特别是人体内抗病抗体产生的疫苗主要有四类,即活疫苗、死疫苗或灭活疫苗、亚单位疫苗及类毒素。其中,活疫苗可以使宿主产生最强的免疫反应。通常,这些活疫苗在某些细胞系中经过适当次数的传代并减毒后,可使之得以增加对抗原的免疫反应时间,并且不诱发与之相关的疾病。也可以用化学或其他适当的方法将疫苗病原因子失活,以制备灭活的死疫苗,但这些方法并不能使宿主免疫系统中存在的抗原因子失活。

就甲型肝炎病毒疫苗而言,目前主要是仍处于临床试用阶段的基于甲型肝炎 HM-175 病毒株的减毒疫苗(Merck Co.)和已在中国境内普遍应用的,分别基于甲型肝炎病毒株 H₂ 和甲型肝炎 H-A-1 病毒株的减毒活疫苗(分别由中国医学科学院医学生物学研究所(中国昆明)和中国卫生部长春生物制品研究所(中国长春)生产)。大规模临床接种试验表明,这些疫苗,特别是基于甲型肝炎 H-V-1 病毒株的减毒活疫苗,目前尚未发现在免疫接种后临床上有任何有意义的不良反应。血清学试验结果显示,接种这些活疫苗后绝大多数受试者都产生良好的抗体反应,仅一次接种后即达到 95% 以上的抗体阳性率,并且在接种后的 4-8 周均达到相当高的抗体滴度(参见中国专利 92114998.0 号)。

然而,迄今使用的甲型肝炎疫苗基本上都是水悬浮液形式的,这些液体制剂与现有的其他病毒或细菌疫苗制剂的一个共同缺点是缺乏足够高的贮存稳定性。一般说来,这些液体制剂在常温下保存极不稳定,例如悬浮液状态的甲型肝炎

炎疫苗在常温下通常只能贮存大约 3 个月的时间, 既使在 2-8 °C 的低温度条件下也仅有 3-6 个月的贮存有效期。因此, 这些疫苗必需在很低的温度条件下贮存运输和使用, 从而使为疫苗的大规模推广和使用, 特别是在经济不发达地区及热带和亚热带地区的推广和使用受到很大的限制。

为了解决上述问题, 本发明人在长期的研究和生产实践中发现, 在按已公开的方法(例如按中国专利 92114998.0 号中所述的方法)生产的甲型肝炎减毒活疫苗原液中加入一种适当的保护剂, 然后基于适当的冷冻干燥曲线, 将所得甲型肝炎疫苗组合物制成冻干形式的疫苗制剂, 将使疫苗的贮存有效期限至少延长一倍, 从而大大减少了疫苗的贮存、运输和使用过程中的“冷链”压力和费用消耗, 降低了疫苗的损失, 提高了疫苗的使用效率, 为疫苗的大规模推广使用提供了重要条件。

可以按照已公开的方法例如中国专利 92114998.0 号中公开的方法制备减毒的甲型肝炎病毒疫苗培养液(病毒原液), 然后将本发明的病毒活疫苗保护剂按适当的比例(例如 1:1(V/V)的比例)与所得病毒原液相混合。无菌条件下分装后, 置于冷冻干燥装置内进行冻干处理, 以得到本发明的冻干形式的甲型肝炎减毒活疫苗组合物。一般说来, 基于我们建立的冻干曲线, 首先将此甲型肝炎减毒活疫苗组合物于大约-30 至-50 °C, 最好在大约-40 °C 温度下预冷冻 3 至 6 小时, 然后于大约 25 至 35 °C 的温度下真空干燥约 10 至 20 小时, 以得到本发明的冻干的甲肝病毒减毒活疫苗。

中国专利 92114998.0 号中详细描述了制备甲型肝炎病毒减毒株 L-A-1 的方法, 以及以所说的甲型肝炎 L-A-1 减毒活病毒株为毒种, 工业规模生产甲型肝炎疫苗的方法。简单地说, 该方法包括首先将人胚肺二倍体细胞按 1:2 至 4 的分种率, 使用加有 10-15% 小牛血清的极限基本培养基(MEM)(pH7.2-7.6)扩增传代。将细胞培养瓶置于 37 °C 下旋转培养 5-8 天, 使之生长成致密的细胞单层。然后弃去生长培养液, 并以新鲜的 Earle 氏液反复冲洗细胞 3-5 次。洗细胞后, 接种按中国专利 92114998.0 号实施例 1 中所述方法制备的种子病毒悬浮液, 并补加细胞生长维持液(加有维生素 C 的乳白蛋白水解液), 于 34-36 °C 下培养。每周换液一次。约 4 周后弃去维持液和残留的小牛血清, 并直接加入含低浓度盐(例如 1-10mM NaCl)并且不含酚红的 199 综合培养液。继续培养(34-36 °C) 4 至 6 天后, 收集细胞。经三次反复冻融后超声破碎细胞, 合并溶胞产物并离心除去细胞碎片, 收集上清即得到甲型肝炎病毒减毒疫苗悬浮液。

另外，也可按照中国专利 85107525 号中所述的方法制备用于本发明的方法的甲型肝炎病毒减毒活疫苗悬浮液。

本发明进一步提供了可使冷冻干燥形式的病毒活疫苗长时间保持生物学活性的冻干病毒活疫苗保护剂，该保护剂基本上由人血清白蛋白和/或明胶、海藻糖、抗坏血酸，选自谷氨酸、精氨酸、天冬氨酸和赖氨酸的一种或两种氨基酸或其碱金属盐、尿素，以及甘露醇和肌醇组成。所说的保护剂中各基本成分的含量分别为人血清蛋白 0-20g/L，明胶 5-10 g/L，海藻糖 50-100 g/L，谷胺酸钠 7.5-15 g/L，抗坏血酸 0.5-1 g/L，尿素 5-28 g/L，山梨醇 2-10 g/L 和肌醇 5-10 g/L。

甲型肝炎病毒是一种不带有包膜，也不含脂质的微小核糖核酸病毒。甲型肝炎病毒与大多数其他病毒一样，无论以悬液形式或冻干形式存在，常温下均很容易被失活，失去其再生、增殖和对任何适当宿主的感染能力。然而，由于失活后的病毒仍存在病毒衣壳蛋白，故仍存在刺激宿主生物体产生抗体的免疫原性。从预防和治疗目的考虑，活疫苗可通过其改造野生病毒、诱发体液免疫反应及淋巴细胞介导的细胞免疫反应达到预防病毒感染并杀灭侵染机体的病毒的目的。但活疫苗一旦由于不适宜的冻干等处理、运输或储存等条件被失活，便难于达到死疫苗所具有的免疫保护能力，甚至只为死疫苗的几十分之一。因此，寻找并利用适当的活疫苗保护剂，制备可以在常温甚至更高温度下保留的冻干病毒活疫苗，便成了一个亟待解决的问题。

在如上文所述的本发明的活病毒疫苗保护剂中，人血清白蛋白和明胶主要发挥蛋白质和胶体支架作用，为悬液或冻干后的活病毒提供空间支持和部分营养保护作用。海藻糖具有稳定细胞和蛋白质结构、抵御高温破坏的功能。研究证明，在海藻糖存在下干燥处理的抗体、酶、病毒等生物材料，当重新水合后均能恢复其活力(Roser B., Food Sci & Technol. 2(7): 166-169, 1991; Roser B., Biopharm. 4(8): 47-53, 1991; Roser B., Colace C., New Scientist, 138:24-28, 1993)。利用海藻糖干燥处理小儿麻痹疫苗已获得了成功。谷氨酸等碱性氨基酸盐、尿素、山梨醇和肌醇，以及抗坏血酸，在本发明的冻干保护剂中则主要起到调整 pH、稳定水合状态或脱水过程中的渗透压，以及抗氧化等作用。

可以在适当的容器内，按常规试剂配制方法配制本发明的病毒疫苗保护剂，但在混入海藻糖、明胶、山梨醇或肌醇之前，应将这些物质于 37 °C 下预加热 24-48 小时，并且在分装待冻干的疫苗前 0.5-2 小时将保护剂与待冻干疫苗以大约 1:1(V/V)的比例混合均匀。用于冷冻干燥处理的甲型肝炎减毒活疫苗是按常规方

法(如按中国专利 92114998.0 号所述的方法)制备的悬液形式的甲型肝炎减毒活疫苗。可使用常规冷冻干燥装置将分装好的上述混合液于-30至-50℃下预冻3-6小时,然后于28至35℃下真空干燥8至12小时。冻干过程中,疫苗冻干混合物的共融温度低于-40℃。

为了证实本发明的病毒疫苗保护剂在生产冷冻干燥形式的病毒活疫苗中的保护作用,及其对冷冻干燥的病毒活疫苗储存稳定性的影响,我们以甲型肝炎减毒活疫苗为例,对其在加入和不加入本发明冻干保护剂条件下,冻干前和冻干后的病毒浓度,以及冻干保护剂对疫苗病毒之储存稳定的影响进行了一系列比较试验。试验结果显示,本发明的病毒活疫苗保护剂不仅在冷冻干燥处理过程中对甲肝病毒活性具有极好的保护作用,而且可以显著地提高甲肝疫苗在冻干状态下和提高的温度下的贮存稳定性。

在此基础上,我们还以同样方法检测了本发明的冻干保护剂对麻疹减毒活疫苗,以及甲肝—麻疹二联疫苗进行了相似的冻干前后病毒(活性)浓度比较试验和冻干制品在不同温度与贮存时间条件下的贮存稳定性试验。试验结果显示,本发明的病毒活疫苗保护剂同样可有效地保护麻疹活疫苗及甲肝—麻疹二联疫苗在冷冻干燥处理过程中的病毒抗原活性,以及这些病毒疫苗在冻干制品在提高了的温度下的贮存稳定性。

令人惊奇的是,我们的试验还发现,当用于某些无包膜病毒,如麻疹病毒或脊髓灰质炎病毒等病毒减毒活疫苗时,在如前所述的冻干病毒保护剂中加入极少量或完全不加入人血清白蛋白,同样可以达到良好的冻干保护效果。

实施例1:病毒活疫苗冷冻干燥保护剂(I)的制备

按下列配方配制含有人血清白蛋白的病毒活疫苗冷冻干燥保护剂(I):

成 分	含 量(g/L)
人血清白蛋白	10.0
明胶	5.5
海藻糖	65.0
谷氨酸钠	10.0
尿素	20.0
抗坏血酸	5.5
山梨醇	6.5
肌醇	7.5

首先将医药用白明胶 5.5g 溶解大约 300ml 蒸馏水中，加热煮沸使之溶解后，于大约 116 °C 下高压蒸汽灭菌 40 分钟，然后室温冷却至 30-35 °C。向所得明胶溶液中加入 10.0g 使用 0.22 μm 滤器或滤柱(0.1、0.2、0.5、1.0 μm)过滤除菌的人血清白蛋白(长春生物制品研究所生产)，并充分搅拌混匀后备用。

称取上述重量的海藻糖、尿素、抗坏血酸、甘露醇和肌醇，并依次加入到大约 500ml 蒸馏水中。然后在振荡搅拌下将混合物于 37 °C 预加热约 24 小时，冷却至室温(22 ~ 26 °C)后将所得混合物溶液与上述的明胶—血清白蛋白混合均匀，加入蒸馏水补足体积(1L)并用 0.1N HCl 将 pH 调到约 7.0。再次过滤除菌后即得到本发明的病毒活疫苗冷冻干燥保护剂(I)。

实施例 2：病毒活疫苗冷冻干燥保护剂(II)的制备

基本上按照实施例 1 所述的方法配制含下列成分的病毒活疫苗冷冻干燥保护剂(II)：

<u>成 分</u>	<u>含 量(g/L)</u>
明胶	8.5
海藻糖	75.0
尿素	15.5
L-精氨酸	10.1
抗坏血酸	3.0
山梨醇	5.5
甘露醇	6.5
肌醇	4.0

与保护剂(I)不同的是，本实施制备的保护剂(II)不含有价格较贵并且有可能导致肝炎甚或 HIV 病毒污染的人血清白蛋白，并且其中以 L-精氨酸或其钠盐代替保护剂(I)中的谷氨酸钠。另外，该保护剂(II)中添加了少量的可能进一步提高保护效果的甘露醇。

实施例 3：甲型肝炎减毒活疫苗冻干制剂的制备

按照中国专利 92114998.0 号中所述方法制备甲型肝炎病毒减毒活疫苗。简

单地说,首先用本研究建立的甲型肝炎 H-A-1 病毒株感染按适当分种率传代增殖的人胚肺二倍体细胞,并且于 35℃ 孵箱中连续培养 4 周,每周更换培养液一次。4 周后弃去维持液及残留的小牛血清,并加入含低浓度盐但不含酚红的 199 综合培养液。继续培养 4-6 天后收集细胞。经三次反复冻融并超声破碎细胞后,离心除去细胞碎片,收集上清液即得到悬液形式的甲型肝炎病毒减毒活疫苗。

将按照实施例 1 中所述方法制备的保护剂(I)以 1:1(V/V)的比例加入到检定合格的甲肝病毒活疫苗悬浮液中,混匀后无菌分装并置于密闭的真空冷冻干燥器(FS150-SS20C 型, Hull Co., USA)内进行冻干处理。首先将疫苗混合物于大约 40℃ 下预冻 4 小时,然后升温至 32℃ 真空干燥约 15 小时即得到所需的冷冻干燥的甲型肝炎减毒活疫苗。

实施例 4: 麻疹病毒减毒活疫苗冻干制剂的制备

按照现行的中国生物制品规程中《麻疹减毒活疫苗制备与检测规程》的要求制备悬液形式的麻疹减毒疫苗。将该疫苗悬液与按实施例 2 中所述方法制备的减毒病毒活疫苗保护剂(II)以 1:1(V/V)的比例混合。将此疫苗混合物于大约 40℃ 预冷冻 5 小时,然后于大约 34℃ 下真空干燥约 14 小时,得到所需的冷冻干燥的麻疹病毒减毒活疫苗。

实施例 5: 冷冻干燥的甲型肝炎病毒减毒活疫苗的贮存稳定性

首先用无菌水对按实施例 3 所述方法制备的冻冷干燥的甲肝疫苗进行 10 倍系列稀释。然后取 10^{-5} 稀释度稀释的病毒液作为实验组,并以不加本发明的冻干保护剂冷冻干燥的甲肝病毒减毒活疫苗作为对照。将两者分别接种于人胚肺二倍体细胞中,35℃ 培养 28 天后收集培养物并离心分离溶胞产物的上清液,使用标准的甲型肝炎病毒滴度检测试剂盒,以酶联免疫吸附法(ELISA)和免疫荧光(IF)法检测甲型肝炎病毒滴度。结果显示,同一批号疫苗样品冻干前疫苗的病毒感染性浓度(TCID₅₀/ml)分别为 6.67 和 6.68。加入本发明冻干保护剂冷冻干燥的样品,冻干后 5 份实验组样品的感染滴度为 6.33 至 6.50,而不加本发明冻干保护剂冷冻干燥的样品,冻干后 5 份对照组样品的感染滴度则下降到 1.33 至 2.33。

在另一项试验中,则观察到在加入本发明的保护剂的情况下,本发明的冷冻干燥的甲肝减毒疫苗(5 个批号)在冻干前和冻干后的病毒感染性滴度下降值不大于 0.5Log TCID₅₀/ml。

在此基础上, 本实施例进一步按上述相似的方法试验了在有保护剂存在时, 甲型肝炎减毒活疫苗冻干制品于 4 ~ 8 °C 温度下, 分别贮存 3 至 12 个月的贮存稳定性, 并比较了甲肝病毒减毒活疫苗悬液态制剂和冻干制剂在 2 ~ 8 °C、室温及 37 °C 温度条件下的贮存稳定性, 结果分别如下列表 1 和表 2 所示。

表 1 加保护剂冻干的甲肝减毒活疫苗于 4 ~ 8 °C 下的贮存稳定性

样品批号	不同储存时间(月数)后检测的病毒感染性滴度(TCID ₅₀ /ml)				
	0	3	6	9	12
1	6.50	6.67	6.67	6.50	6.50
2	6.67	6.50	6.67	6.50	6.67
3	6.50	6.50	6.33	6.50	6.50
4	6.50	6.67	6.67	6.50	6.33
5	6.33	6.50	6.50	6.50	6.33

表 2 甲肝减毒活疫苗液体制剂和加保护剂冻干的冻干制剂的贮存稳定性的比较*

贮存温度	有效贮存期	
	液体制剂	冻干制剂
2 ~ 8 °C	3 个月	12 个月
室温 (25 °C)	7 天	3 个月
37 °C	1 天	7 月

*所给数据为 5 批样品的平均值。

从上列表 2 和表 3 中所示的结果可以看出, 本发明的病毒活疫苗保护剂具有在干燥、高温和渗透压条件下稳定病毒蛋白质及核酸结构, 有效地维持疫苗病毒的活力, 从而大大延长其有效贮存的时间的作用。

实施例 6: 冻干的甲型肝炎减毒活疫苗的免疫原性和安全性试验

以每 5 只血清甲肝病毒(HAV)试验阴性, 血清谷氨酸草酰乙酸转氨酶(SGPT)水平正常的健康恒河猴(平均体重 4.5Kg)为实验对象, 以按实施例 3 所述方法制备并于室温下贮存 1 个月的冻干的甲肝病毒减毒活疫苗为实验组, 并以未经冻干处理也不加存冻干保护剂的甲肝病毒减毒活疫苗悬液制剂作为对照. 分别给实验组(1-3 组)动物静脉接种实验疫苗样品 1.0ml, 第 4 组(对照组)动物则静脉接种对照疫苗样品。接种后 0、2、4、6 和 8 周采集动物静脉血液, 检测动物血清 SGPT 值和抗 HAV 抗体滴度。同时, 对各组动物进行肝组织穿刺并进行活体组

织学检查。结果如下：表 3 所示。

表 3 冻干的甲肝减毒活疫苗接种后对 HAV 抗体生成和肝脏功能及组织学改变的影响

疫苗 批号	SGPT*				抗 HAV 抗体阳性率**				抗 HAV IgG 阳性率**			
	0	2	4	8(w)	0	2	4	8(w)	0	2	4	8(w)
1	17	18	15	13	0/5	3/5	5/5	5/5	0/5	3/5	2/5	0/5
2	20	17	14	12	0/5	2/5	5/5	5/5	0/5	4/5	2/5	0/5
3	19	19	20	16	0/5	3/5	4/5	5/5	0/5	3/5	2/5	1/5
对样品	20	21	18	19	0/5	3/5	3/5	5/5	0/5	4/5	1/5	0/5

* 采用赖氏法检测 SGPT，结果（5 只动物的平均值） $\geq 25\text{U/ml}$ 为肝转氨酶异常升高；

** 所给数值为各组 5 只动物的阳转率。

从表 3 所示结果可以看出，本发明的冻干甲肝减毒活疫苗在经过冷冻干燥处理并于室温(25℃)下贮存 30 天后，仍保留有其原始状态下的免疫原性和使用安全性。冻干过程和室温贮存 30 天期间基本上没有导致疫苗生物学功能的丢失。

实施例 7：冷冻干燥的麻疹病毒减毒活疫苗的储存稳定性

基本上按照实施例 5 中所述方法检测冷冻干燥的麻疹减毒活疫苗在冻干前和冻干后病毒感染性滴度的改变，以及冻干的麻疹活疫苗分别在 4 ~ 8℃和 37℃温度下的贮存稳定性。

结果显示，使用本发明的病毒活疫苗冻干保护剂冷冻干燥麻疹病毒减毒活疫苗，冻干处理过程导致的 5 批疫苗样品的滴度下降平均 $< 0.5\text{Log CCID}_{50}/\text{ml}$ 。冻干的麻疹减毒活疫苗在 4 ~ 8℃下贮存 15 个月活性降低 $< 0.5\text{Log CCID}/\text{ml}$ ，37℃温度下贮存 4 周活性下降 $< 1.0\text{Log CCID}_{50}/\text{ml}$ 。